

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

VIRUSI I PODRIJETLO ŽIVOTA

VIRUSES AND THE ORIGIN OF LIFE

SEMINARSKI RAD

Karlo Jezernik
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: Doc. dr. sc. Damjan Franjević

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	2
2. PODRIJETLO ŽIVOTA.....	3
3. DEFINIRANJE ŽIVOG SUSTAVA.....	3
3.1. Virusi nemaju mnoge osobine živog sustava.....	4
3.2. Virusi su stari i bili su aktivni pokretači evolucije.....	5
3.3. Virus hallmark genes – geni svojstveni samo virusima.....	6
3.4. Virus nije isto što i virion.....	6
3.5. Zaključno o prirodi virusa.....	7
4. Virusi.....	7
5. PODRIJETLO VIRUSA.....	9
5.1. Retrogradna hipoteza.....	10
5.2. Virusi kao odbjegli genetički elementi.....	10
5.3. Virusi kao ostatci drevnog predstaničnog svijeta.....	11
6. ULOGA VIRUSA U EVOLUCIJI.....	12
6.1. Virusi i DNA replikacijski enzimi.....	13
6.2. Zašto je nastala DNA i moguća uloga virusa.....	14
6.3. Nastanak DNA virusa	16
6.4. Prijenos DNA iz Virus u stanice.....	17
6.5. Virusna nukleogeneza.....	19
6.6. Virusi i tri moderne stanične domene.....	20
7. LITERATURA.....	22
Eigen, M. i Winkler-Oswatitsch R. 1992. Steps towards life: A perspective on evolution. Oxford University Press, str. 30-37.....	22
8. SAŽETAK.....	25
9. SUMMARY	25

1. UVOD

Zemlja je planet po mnogočemu poseban i različit od ostalih planeta u našem sunčevom sustavu, a zasigurno najveća osobitost naše planete je njena površina. Ona je prekrivena šumama i vodama u kojima se razvio život. Postanak života ili abiogeneza je za sada nedokučiva misterija sa mnogo predloženih teorija koje ne mogu biti provjerene.

Nakon što je nastao život se počeo razvijati i postajati sve složeniji. Razvitak života proučava evolucijska biologija, a temelj joj je teorija evolucije, koja nije samo teorija nego možda najpotkrepljeniji skup činjenica u cijeloj znanosti uopće. Živi svijet je sistematiziran i svaka životinjska vrsta (biljke i gljive također) spada u jednu od 3 domene života. Koristeći tehnike molekularne biologije Woese je zaključio da se svi danas živeći oblici mogu podijeliti na bakterije, arheje i eukariote (Woese 1987, 1990) i da je međusobna evolucijska udaljenost između prokariota, organizama kod kojih nasljedna informacija nije obavijena membranom (arheje i bakterije), i između prokariota i eukariota (organizmi koji imaju jezgru) gotovo jednaka.

Darwinova teorija pretpostavlja postojanje zajedničkog, univerzalnog pretka svih živih bića. On ima i svoje ime, zove se LUCA (last universal common ancestor). Gledajući u prošlost možemo retrogradno pratiti evoluciju života, najkasnije su se razvili eukarioti, s tim da su višestanični eukarioti vjerojatno nastali od jednostaničnih oblika, koji su pak nastali od jednostaničnih prokariota (višestanični prokarioti ne postoje, ali neke vrste mogu posjedovati višestaničnost u jednom dijelu životnog ciklusa). Krećući se dalje u prošlost dolazimo do LUCA-e. O njemu ne znamo mnogo, tek da je vjerojatno imao DNA za svoj genom, jednostavne enzime za replikaciju i sintezu proteina te da nije imao jezgru. Pa ipak postoji organizam koji nam može pomoći rekonstruirati povijest života.

Virusi su najbrojniji biološki entiteti i pokazuju najveću varijaciju genoma. Do nedavno virusi nisu smatrani zanimljivima, promatrani su u kontekstu uzročnika bolesti i svi (osim virologa) nisu vidjeli koristi u njihovom proučavanju. Oni nemaju za sada ni mjesto na stablu života (eng: The tree of life, TOL) prvenstveno zbog toga što se smatra da nisu živi (ali ni mrtvi). Mogućnost kristalizacije i nemogućnost replikacije i sinteze proteina bez stanica kao domaćina su samo neki od argumenata koji se koriste za opravdanje te teze. No s nedavnim povećanjem interesa za proučavanje virusa slika o njima se dramatično mijenja. Ideja da su virusi vrlo stari i da potječu iz RNA svijeta sve je prihvaćenija. Prema njoj RNA virusi su bili prvi (od virusa) i bili su interakciji s LUCA-om. Retrovirusi su bili aktivni pokretači evolucije, a DNA virusi su omogućili prijelaz iz RNA u DNA svijet. Mijenjajući

glavnu informacijsku molekulu izumili su i glavne replikacijske enzime koje danas koriste stanični organizmi. Patrick Forterre, francuski istraživač, virusima pripisuje i zasluge za nastanak eukariotske jezgre, a i predlaže kontroverznu tri virusa – tri domene teoriju.

2. PODRIJETLO ŽIVOTA

Život nije nastao odjednom. Potrebni su mnogi koraci i preduvjeti za njegov nastanak . Stoga prije nego se definira život potrebno je sagledati činjenice o njegovu nastanku.

Radioaktivnim datiranjem najranijih stijena postavljen je najdonji limit starosti zemlje na 3,8 do 3,9 milijardi godina, a nezavisnim istraživanjima starost zemlje je procijenjena na 4,55 milijardi godina. Fosilni ostatci najstarijih organizama su stari 3,8 milijuna god., bilo je potrebno 700 milijuna godina da se stvore uvjeti za formiranje prvih organizama.

Postanak života se može oblikovati kao niz emergentnih (emergencija=pojavljivanje, iskrsavanje) događaja od kojih je svaki dodao nove strukture i kemijsku kompleksnost prebiotskoj zemlji. Prvi ključan korak morala je biti sinteza i akumulacija spojeva baziranih na ugljiku. Stanley Miller i Harold Urey su pokazali da se organska sinteza mogla odvijati na površini rane zemlje. Oponašajući uvjete koji su vladali uspjeti su iz anorganskih spojeva dobiti organske. Kemijska evolucija je prethodila biološkoj (Hazen, 2009).

Građevni elementi života : aminokiseline, šećeri, lipidi i drugo, nastali su kemijskim reakcijama u prebiotskom okolišu. Međusobnim udruživanjem pojedinačnih blokova nastaju makromolekule. Nukleinske kiseline su lanci baza vezanih na šećere povezanih fosfodieterskom vezom, a proteini su polimeri aminokiselina. Sav živi svijet sadrži ove dvije makromolekule i one su nužan preduvjet za nastanak života. Tokom kemijske evolucije djeluje i selekcija. Makromolekulski sustavi koji su se izolirali od okoline, bilo membranom, ili posebnim mjestom u okolišu bili su u prednosti i uspjeti su se održati. Kemijska evolucija završava nastankom predstaničnih tvorbi, protobionata iz kojih su prema modelu nastali prokarioti (Hazen, 2009). Daljnji razvoj predstavlja biološku evoluciju koja je dala raznolikost života kakvog danas poznajemo.

3. DEFINIRANJE ŽIVOG SUSTAVA

Stablo života (TOL) je grafički prikaz odnosa između članova zajednice koji su , prema nama, kvalificirani za život. Ono prikazuje evolucijske odnose između vrsta, njihovu povijest i međusobnu povezanost. Iako nužne, replikacija i metabolizam nisu jedine značajke živog sustava. On mora posjedovati sustave za regulaciju i homeostazu. Kombinirajući zamisli Manfreda Eigena i Klause Dosea (Eigen i Winkler-Oswatitsch, 1992) karakteristike žive tvari su:

- razmnožavanje
- mutacije
- metabolizam
- kontrola unutrašnjih funkcija
- membrane koje odvajaju sustav od okoline

dodamo li ovom NASA-inu definiciju koja kaže da je život samoodrživ kemijski sustav sposoban za provođenje Darwinovske evolucije (Kolb i Liesch) obuhvatili smo većinu karakteristika koje život treba imati.

3.1. *Virusi nemaju mnoge osobine živog sustava*

Posjeduju li virusi osobine zbog kojih zaslužuju epitet živih organizama stvar je perspektive. Većina biokemičara, biologa i virologa drži da kada se sagledaju svi argumenti oni upućuju na ne-živost virusa. Virolozi su svoje mišljenje izrazili i službeno preko međunarodnog odbora za virusnu taksonomiju (Moreira, López-García, 2009). Virus nemaju vlastiti metabolizam i nisu samoodrživi, dakle samo na temelju ovoga priča o virusima kao obliku života može završiti. Oni se ne mogu samostalno ni replicirati ni evoluirati. Iako neki virusi kodiraju vlastite polimeraze njihova ekspresija ovisi o stanicama, prema tome bez stanica nema ni virusne evolucije (Moreira, López-García, 2009). Velika raznolikost virusa je rezultat evolucije između virusa i njihovih domaćina, gdje su virusi uzimali od stanica genetički materijal i tako generirali raznolikost.

Virusno podrijetlo je nepoznato. Znanstvenici koji smatraju da se viruse ne može uvrstiti na stablo života često ističu njihovo polifiletsko podrijetlo. Ako su virusi polifiletski ,

znači da nemaju zajedničkog pretka i da su odvojene klase virusa nastale nezavisno. Usporedba RNA i dna virusa jasno upućuje na to, RNA virusi su nastali prvi, a DNA virusi su se razvili kasnije. Moreira i Lopez- Garcia niječu postojanje drevnih virusnih linija. Ne postoji gen koji je prisutan kod svih virusa, sličnosti u strukturnim motivima kapsidnih proteina, smatraju oni, su rezultat konvergencija i horizontalnog transfera gena (horizontal gene transfer, HGT). Virusne kapside da bi bile stabilne mogu imati mali broj različitih konformacija i vjerojatnost da će kapsidni proteini evoluirati prema zajedničkom motivu nije zanemariva. HGT je prijenos gena bez izravnog nasljeđivanja i njime se geni mogu prenijeti između različitih (često evolucijski udaljenih) vrsta. HGT je posebno važan za prokariote, na ovaj način bakterije stječu otpornost na antibiotike. Virusi obilno iskorištavaju horizontalni transfer gena stoga je za očekivati da različiti virusi imaju iste gene. Velika učestalost HGT-a otežava rekonstrukciju virusne povijesti jer miješa gene te je njihov izvor teško pratiti (Moreira, , López-García , 2009).

Polifilija i kasni nastanak bez gena koji su samo naizgled homologni (od zajedničkog pretka) približava viruse sebičnim genskim elementima i prema tome treba ih promatrati odvojeno od staničnog života. Usporedba staničnih i virusnih osobina dana je na Slici 1.

Trait	Cells	Viruses
Information content	Yes	Yes
Self-maintenance	Yes	No
Self-replication	Yes	No
Evolution	Yes	By cells
Common ancestry	Yes	No
Structural historical continuity	Yes	No
Genes involved in carbon metabolism	Yes	Cellular origin
Genes involved in energy metabolism	Yes	Cellular origin
Genes involved in protein synthesis	Yes	Cellular origin

Slika 1. Usporedba osobina stanica i virusa

Preuzeto iz Ten reasons to exclude viruses from the tree of life,

Moreira, , López-García , 2009

3.2. Virusi su stari i bili su aktivni pokretači evolucije

Mali broj istraživača zastupa drugu stranu, ali njihove zamisli imaju vrlo jak odjek. Ako su virusi glavni pokretači evolucije koji su služili kao golem izvor genskih noviteta, podrijetlo njihovih gena može se pratiti. Neki autori smatraju da postoji dovoljno dokaza koji upućuju na virusno podrijetlo replikativnih mehanizama. Nisu virusi bili ti koji su uzimali gene iz stanica nego upravo suprotno: stanice su bile te koje su uzimale gene iz virusa (Forterre, 2009.a). Ovi autori smatraju da su virusi postojali prije LUCA-e. LUCA (Last universal common ancestor, Woese, 1998.) je hipotetski predak svih živućih organizama i vjerojatno je imao DNA genom. Virusi i LUCA se međusobno reagirali, ali prvi virusi imaju RNA genom, potječu iz RNA svijeta i dio su drevne virosfere. Forterre definira RNA svijet kao biosferu stanica sa RNA genomom (Forterre, 2006.). Genetičkim analizama utvrđena su 324 gena specifična za LUCA-u, ali među njima nisu geni za DNA replikaciju (Villarreal, 2004). Villarreal i Forterre smatraju da su DNA virusi mogli biti ti koji su preuzeli zadaću replikacije, ali imaju različita stajališta kako je do toga došlo. Obojica se slažu da HGT nije u tolikoj mjeri poremetio odnose između različitih virusnih linija, a u slučaju kada geni domaćina pokazuju sličnost s genima virusa, virusni gen je stariji i prenesen je u domaćina. Iz ovih tvrdnji se izvodi zaključak, virusi mogu evoluirati i mogu pokretati evoluciju svojih domaćina, postoje geni karakteristični za viruse koji nisu rezultat konvergencije te viruse ne oblikuju stanice nego upravo suprotno.

3.3. Virus hallmark genes – geni svojstveni samo virusima

Prisutnost originalnih virusnih gena upućuje na postojanje drevnog virusnog svijeta. Znatno broj gena koji kodiraju proteine bitne za replikaciju, ekspresiju drugih gena i proteine kapside zajednički su za nepovezane grupe virusa. Ti proteini nemaju stanične analoge i nema dokaza o njihovom staničnom podrijetlu. Dva najraširenija proteina su jelly roll capsid protein (JRC) i helikaza iz superobitelji 3. Prisutni su i u RNA i DNA virusima (Koonin i sur., 2006). RNA ovisne RNA polimeraze i reverzne transkriptaze su primjeri replikacijskih enzima s očuvanim proteinskim motivima. Domena dlana RNA polimeraza vjerojatno je bila primordijalna polimeraza nastala u RNA svijetu dok su polimerizaciju nukleotida još obavljali ribozimi (RNA enzimi). Te polimeraze nisu aktivne u današnjim organizmima, ali ti elementi

su rašireni u genomima mnogih od njih (Koonin i sur., 2006). Geni prisutni samo kod virusa jačaju teoriju o davnom nastanku virusa i temelj su novih teorija o odnosu virusa i staničnih organizama

3.4. Virus nije isto što i virion

Claudiu I Bandea je predložio alternativan pogled na viruse koji ih približava staničnim organizmima. On kaže da virus i virion nisu ista stvar. Virion je infektivna čestica, a virus je stvarni organizam koji nastaje u inficiranoj stanici. Inficirana stanica postaje virusna tvornica u kojoj vlast ima virus. Nakon utišavanja staničnog genoma virusni genom je jedini eksprimiran, inficirana stanica više nije bakterija ili eukariot nego virus sa izgledom stanice (Bandea, 2009). Za ilustraciju postoje cijanofagi (cyanophage- inficiraju cijanobakterije) koji nose informaciju za fotosintetski reakcijski centar. On će zamijeniti propadajući stanični i nastaje fotosintetski virus koji može sebi pribavljati energiju (Forterre, 2009.b).

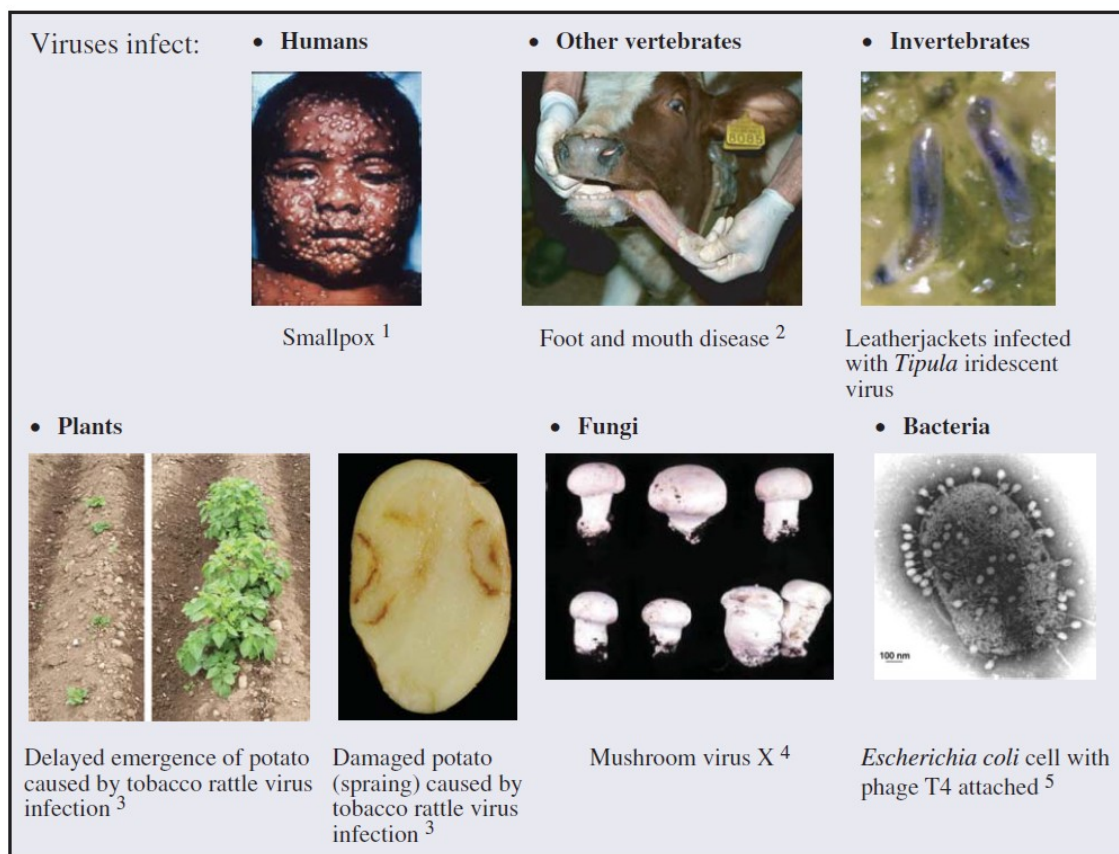
3.5. Zaključno o prirodi virusa

Pokušaji definiranja virusa kao živih organizama su uvelike rezultat novih spoznaja o njihovom podrijetlu i ulozi koju su možda imali u evoluciji prokariota i eukariota. Jaki argumenti za i protiv isključuju jasno definiranje virusa, ali to možda nije ni važno. Stajališta u znanosti se mijenjaju, viruse su stalni stalni pratitelji staničnih organizma (Villareal i Witzany 2009.) te ih možemo promatrati skupa s njima bez obzira definiramo li ih kao žive ili ne.

4. Virusi

Virusi su molekularni genetički paraziti koji koriste stanične sustave za vlastitu replikaciju (Villareal, 2005.). Njihov krug domaćina obuhvaća sve domene života. Poznati su životinjski (kralješnjaci i beskralješnjaci) i biljni virusi, virusi koji inficiraju gljive, bakterijski virusi, pa čak je poznat i virus koji za svog domaćina ima drugi virus. Ovaj posljednji, nazvan

Sputnik, inficira mama virus (Koonin i sur., 2006.) i dao je nove argumente strani koja tvrdi da su virusi živi jer očito virusi mogu egzistirati bez stanica. Pregled virusnih domaćina dan je na Slici 2.



Slika 2. virusi kao paraziti na: životinjama (kralješnjaci i beskralješnjaci), biljkama, gljivama, bakterijama (prokariotima)

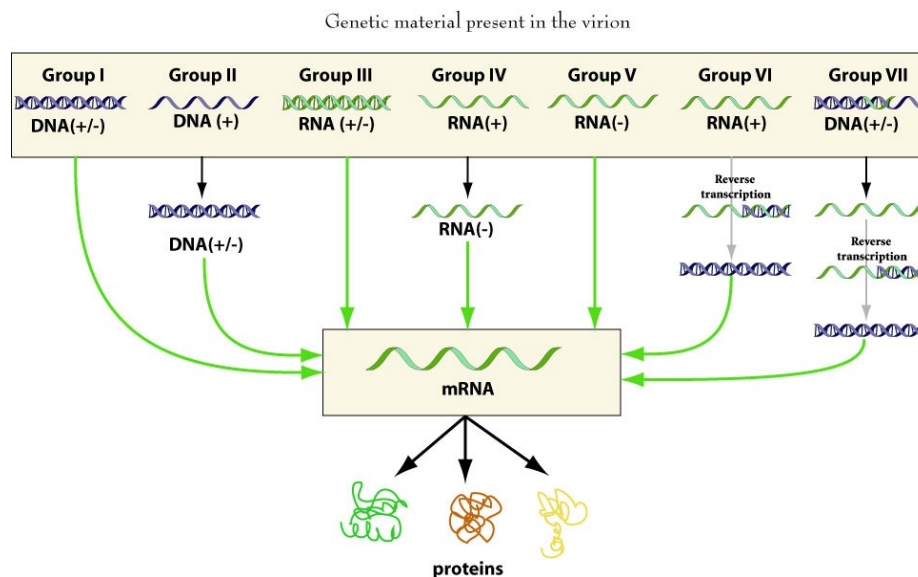
Preuzeto iz Virology: Principles and Applications John B. Carter and Venetia A. Saunders , 2007 John Wiley & Sons, Ltd

Tipičan virus se sastoji od proteinske kapside unutar koje se nalazi genom. Genom je ili DNA ili RNA. Na osnovi genoma i načina replikacije virusi se svrstavaju u jednu od sedam klasa Baltimorove podjele (Slika 3.)

Baltimorova klasifikacija virusa (Koonin i sur., 2006.):

1. dvolančani DNA virusi; koriste (-) lanac kao kalup za RNA polimerazu

2. jednolančani DNA virusi; nakon infekcije formiraju dvostruku DNA, jednolančani lanac je (+), potreban je (-) lanac
3. dvolačani RNA virusi; (-) lanac se koristi za transkripciju (+) lanca koji se koristi kao mRNA
4. jednolančani RNA virusi s genom koji im može izravno poslužiti kao mRNA
5. jednolančani RNA virusi s (-) lancem; potrebna je sinteza komplementarnog lanca za sintezu proteina
6. retrovirusi; imaju jednolančanu (-) RNA, kodiraju za reverznu transkriptazu, DNA je intermedijer i služi za sintezu mRNA
7. virusi koji imaju dvolančani genom koji se replicira preko RNA intermedijera



Slika 3. Baltimorova podjela virusa: virusi su podjeljeni u 7 klasa prema vrsti genoma i načinu replikacije

(www.viralzone.expasy.org)

Važno je naglasiti da ova podjela ne ocrta točno srodstvene odnose i virusi koji pripadaju istoj klasi Baltimorove podjele ne moraju biti filogenetski povezani. Za određivanje bliskosti između virusa upotrebljavaju se analize proteinskih sekvenci. Koriste se homologije u sekvencama, općenito u RNA replikazama i organizaciji genoma.

5. PODRIJETLO VIRUSA

Tri hipoteze o nastanku virusa su do sada predložene. Njihove ideje sažeto je predstavio Burnet u svom predavanju iz 1944. To su degenerativna ili retrogradna teorija, virusi su degenerirani potomci većih patogenih organizama, teorija o virusima kao ostatcima drevnog predstaničnog ili prebiotskog svijeta i teorija o virusima kao genetičkim elementima koji su "pobjegli" iz stanica (Morse, 1994). Da bi razumjeli kakav utjecaj su virusi imali na stanične organizme moramo naše zamisli prilagoditi njihovoj evoluciji.

5.1. Retrogradna hipoteza

Retrogradna teorija prerađena tako da obuhvaća stanične oblike prije LUCA-e. RNA virusi su nastali redukcijom iz parazitskih RNA stanica tako što su postupno gubili svoje enzime za sintezu proteina i produkciju energije (Slika 4. (b)). Prvi korak u prijelazu prema parazitskom obliku mogla je biti podjela staničnog ciklusa između inertne vanstanične faze i unutarstanične faze. U drugom koraku dolazi do raspuštanja membrane unutarstaničnog parazita što mu omogućuje korištenje mehanizama domaćina. Moderne stanice su previše složene i teško bi se kao paraziti uklopili u drugu stanicu, zbog toga su te stanice morale biti mali RNA paraziti koji su lakše mogli izgubiti svoju proteinsku mašineriju i tako postati virusna tvornica (Mahy, van Regenmortel, 2010.).

5.2. Virusi kao odbjegli genetički elementi

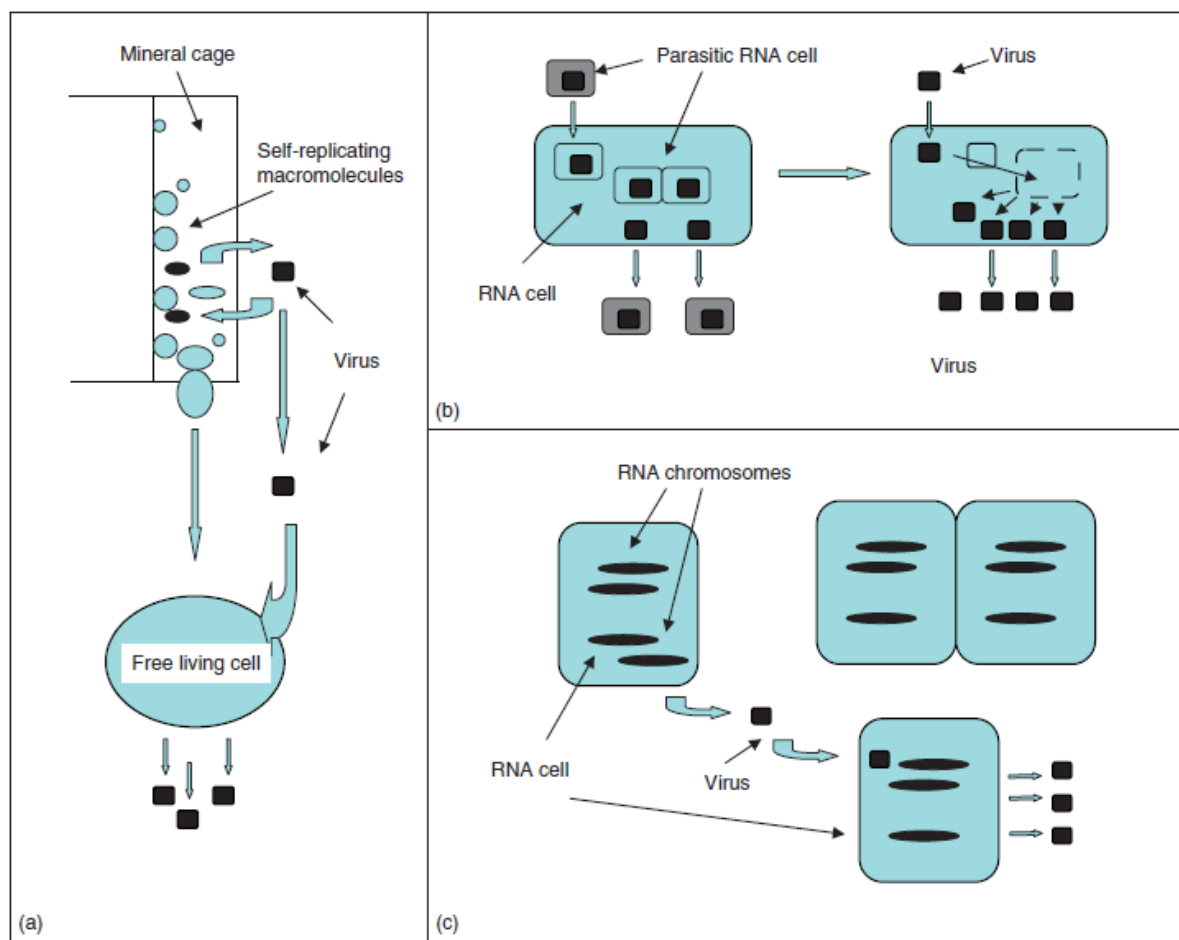
Vremenski ova teorija isto obuhvaća svijet RNA stanica. Predloženo je da RNA stanice nisu imale genom organiziran kao kod današnjih DNA stanica. Genom RNA stanica je bio fragmentiran i sastavljen od poluautonomnih kromosoma koji su se replicirali nezavisno. Takvi kromosomi su se nasumično prenosili iz stanice u stanicu. Raspodjela genoma i stanične mašinerije za sintezu proteina nije bila efikasna kao u današnjih stanica. reprodukcijom takvih primitivnih RNA stanica moglo je nastati miješano potomstvo, jedni su sadržavali oba sustava (genom, sinteza proteina), drugi su mogli dobiti ili samo kromosome ili ribosome. Ova druga skupina bi izumrla osim u slučaju da je stanica sa samo kromosomom

bila sposobna inficirati kompletnu stanicu. RNA kromosomi sa genima koji su im omogućavali infekciju drugih stanica i uz to čuvali vlastiti integritet imali bi selektivnu prednost i možda bi se očuvali (Slika 4. (c)), (Mahy, van Regenmortel, 2010.).

5.3. Virusi kao ostatci drevnog predstaničnog svijeta

Zanimljivo je da su prve misli o nastanku virusa razmatrale mogućnost da su fagi bili prekursori prvih stanica (Felix d'Herelle, 1922.). J.B.S. haldane je razmatrao rani virusni stupanj evolucije kao sastavni dio predloženog scenarija o postanku života iz 'prajuhe' (1928). no vrlo brzo ovaj način razmišljanja je odbačen jer je bio u sukobu sa staničnom teorijom života i tradicionalnom pretpostavkom da virusi nisu živi entiteti (Claverie, 2006).

1980. Wolfram Zilling je oživio ovu hipotezu. Predložio je nastanak virusa u prebiotskom svijetu gdje su kao domaćina koristili primitivnu juhu građevnih elemenata. Proteklih godina ova zamisao je dobila na popularnosti s paralelnim prijedlogom da su stanični organizmi nastali u kasnijoj fazi evolucije života. Novi poticaj je bilo otkriće dramatične razlike između lipida koji sačinjavaju membrane arheja i bakterija. Kako bi objasnili ovu dihotomiju nekolicina autora je predložila da LUCA nije bio stanični organizam i da su stanične membrane nastale odvojeno u arheja i bakterija nakon njihove divergencije. Detaljniju verziju ovog scenarija su sastavili William Martin i Eugene Koonin. U njihovom modelu život se razvio u mineralnim odjeljcima nalik na stanice toplog hidrotermalnog dimnjaka. Virusi su iskrsnuli sklapanjem samoreplicirajućih elemenata koristeći ove anorganske odjeljke kao svoje domaćine. Prave stanice su nastale odvojeno dvama događajima, produkt su bile bakterije i arheje. Prema ovom modelu virusi su prvo koevoluirali s nestaničnim mašinerijama koje su proizvodile nukleotidne prekursore i proteine (slika 4. (a)). Ovaj nestanični život je evoluirao kompeticijom između različitih kemijskih aparata i virusa koji su nastojali inficirati sve veći broj odjeljaka ovog hidrotermalnog sustava (Mahy, van Regenmortel, 2010.).



Slika 4. Tri prerađene hipoteze o virusnoj evoluciji : a) virusi kao ostatci predstaničnog svijeta, b) retrogradna hipoteza, c) virusi kao odbjegli stanični elementi
Preuzeto iz Desk Encyclopedia of general virology, 2010

6. ULOGA VIRUSA U EVOLUCIJI

Pitanje virusnog podrijetla ima 2 moguća odgovora. Virusi su nastali ili prije pojave prvih stanica ili kasnije. Ako su nastali prije stanica oni su mogli utjecati na stanice kada su se pojavile, a mogli su i potaknuti nastanak prvih staničnih organizama. Bakterije imaju svoje viruse koji mogu utjecati na njihovu evolucije. Bakterije sadrže plazmide za koje neki vjeruju da su virusnog podrijetla. Temelj današnjih eukariota je jezgra koja možda predstavlja ostatak nekog virusa, a podjela života na tri domene možda nosi virusni potpis.

6.1. Virusi i DNA replikacijski enzimi

U protekla tri desetljeća sekvenciran je velik broj DNA polimeraza i ostalih replikacijskih proteina iz sve tri domene života. Ove genske sekvence su raspoređene u obitelji i superobitelji i različite filogenetski odnosi su za njih predloženi. Virusi pokazuju veliku raznolikost u polimerazama pa su one iskorištene kao filogenetski markeri za proučavanje davnih odnosa između staničnih i virusnih gena jer između njih postoji najviše homologa (File'e i sur.,2001.).

DNA virusi posjeduju cijeli set vlastitih polimeraza i enzima za popravak. Najproučavanija polimeraza u cijeloj molekularnoj biologiji je ona faga T4. Kada je T4 prvi put sekvencioniran opaženo je da ova polimeraza više nalikuje eukariotskoj nego prokariotskoj polimerazi. Polimeraza bakteriofaga T4 i eukariotska polimeraza imaju između ostalog 6 sličnih funkcionalnih domena i osjetljive su na iste inhibitore. Replikacijski aparati prokariota i eukariota su potpuno funkcionalni i u suštini isti, ali između njih nema očuvanih proteina niti sličnosti u sekvencama (Vilarreal, 2004.). Ovaj rezultat implicira da su polimeraza bakteriofaga T4 i eukariotske polimeraze imale zajedničkog pretka. Sekvencioniranjem cijelog faga pronađeno je da on ima više zajedničkih gena s eukariotima nego bakterijama. Na temelju ovoga Vilarreal i DeFillips su razmišljali da u slučaju ako virus uspostavi stabilnu stalnu infekciju u domaćinu on ga može i snabdijevati svojim genima tako mijenjajući evoluciju svog domaćina. Ako je to točno, možda su virusi bili izvorište dna polimeraza. (Vilarreal, DeFillips, 2000.). Vilarreal i DeFillips su odlučili testirati svoju hipotezu. Odlučili su usporediti sekvence algi i virusa koji ih inficiraju. Dostupne su im bile obilne baze podataka sa sekvencama i po potrebi svoje istraživanje su mogli proširiti na druge viruse i eukariote. Za predmet istraživanja izabrali su dobro proučeni veliki dna virus koji inficira chlorelle, CVS-1 (chlorella species virus) i virus koji inficira smeđe alge (virus feldmanie- feldmania virus species, FVS). CVS-1 uzrokuje akutne infekcije kod zelene alge dok FVS uzrokuje kroničnu infekciju smeđe alge. Alge su izabrali zato što su evolucijski najmlađi eukarioti.

Iz baza podataka izabrali su sve aminokiselinske sekvence koji su imale veću sličnost sa DNA polimerazom iz CVS-1. Analizom su identificirani veliki skupovi povezanih sekvenci. Skupovi su sadržavali polimeraze svih viših eukariota i sve velike obitelji eukariotskih virusa, eukariotske polimeraze za primere (početak replikacije), polimeraze za popravak arheja i bakterija i neke polimeraze faga.

Nakon identifikacije domena koji su najočuvanije među sakupljenim sekvencama mogli su izraditi filogenetsko stablo DNA polimeraza. Genetsko stablo je podržalo ideju da je DNA polimeraza virusa osnova eukariotskih polimeraza, odnosno izgleda da ove virusne polimeraze predstavljaju najbolje kandidate za pretke svih poznatih polimeraza koje repliciraju genome eukariota. Prokariotski i eukariotski geni su povezani preko DNA virusa. Dobiveni rezultati snažno podupri ideju da su virusi omogućili začetak eukariotskih replikacijskih proteina (Villareal, 2004.).

Kao i Vilarreal i Forterre je pisao o virusnom podrijetlu replikacijskih enzima. 1999. je predložio da se mehanizam za replikaciju koji je prvobitno bio prisutan u LUCA-i zamijenio drugim, virusnim, bilo u bakterijskoj liniji ili onoj zajedničkoj eukariotima i arhejama. U korist toga je naveo mnogobrojne virusne DNA replikacijske proteine koji nisu homologni (ali jesu analogni) staničnim. Inspirirala ga je i činjenica da su stanični proteini bakterijskog podrijetla zamijenjeni virusnima tijekom evolucije mitohondrija. Nedavno su pronađena dva specifična eukariotska/arhejska DNA replikacijska proteina, helikaza MCM i primaza, za koje je otkriveno da su kodirane u profagu integriranom u genom bakterije *Bacillus cereus*. Još jedna potvrda da su virusi mogli biti vektori za prijenos gena između domena (Forterre, 2006.).

6.2. Zašto je nastala DNA i moguća uloga virusa

Prema scenariju RNA svijeta osnovna pramolekula života je bila RNA. RNA je služila za pohranu informaciju i katalizirala je vlastite reakcije. DNA/proteini svijet je evoluirao iz RNA svijeta. Dokazi za to su RNA enzimi (ribozimi) koji imaju mogućnost autokatalize i ribozimi koji sudjeluju u formiranju peptidne veze (Ferris).

Sav današnji živi svijet (ako ne promatramo viruse) umjesto RNA ima DNA kao centralnu informacijsku molekulu. Kemijski DNA izgleda kao modificirana RNA. U DNA riboza je zamijenjena deoksiribozom, a uracil citozinom (Forterre, 2005.). Tijekom evolucije DNA je zamijenila RNA zbog 2 razloga:

Stabilnost → deoksiribozi nedostaje kisik na poziciji 2 ugljikova prstena, DNA je stabilnija, otpornija je na hidrolizu i može stvarati dvostruku uvojniciu bez steričkih smetnji (Orgel, 2004.).

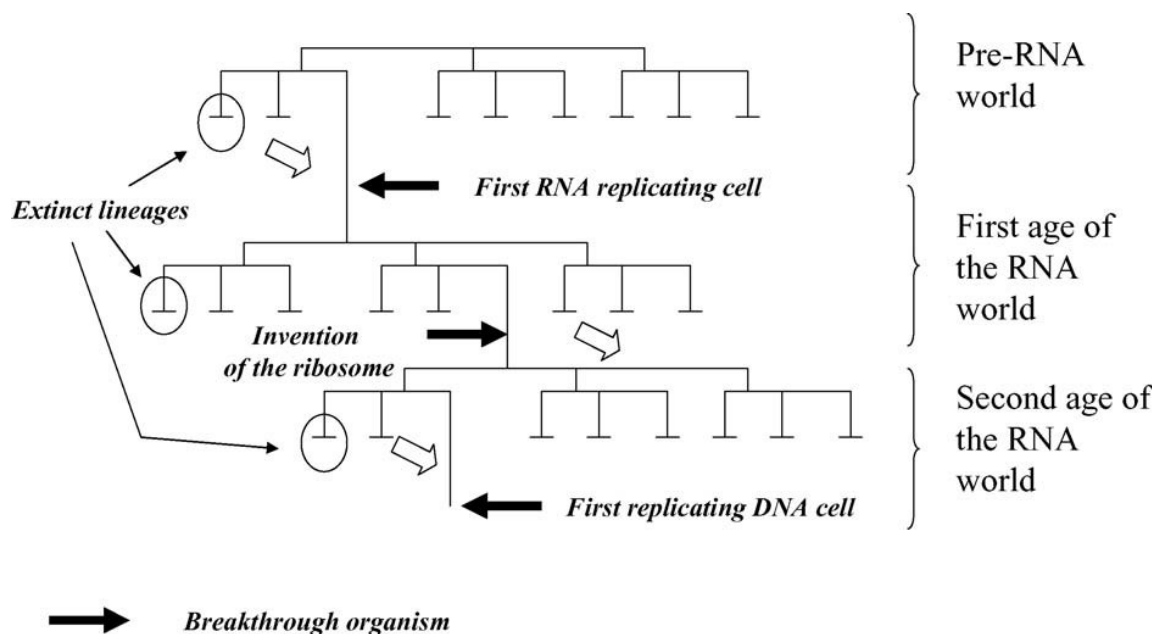
Mogućnost popravka → deaminacijom citozina nastaje uracil koji se može prepoznati i popraviti u DNA, ali ne i u RNA (Orgel, 2004.).

DNA stabilnost i mogućnost popravka omogućili su povećanje genoma te su DNA stanice postajale sve složenije i napokon su u međusobnoj kompeticiji eliminirale svoje RNA pretke. Da bi DNA nastala od RNA potrebni su kompleksni enzimi, a i gore navedeni razlozi nisu sami od sebe dovoljni kao objašnjenje prijelaza.

Hipoteza: DNA i uz nju replikacija, rekombinacija i popravak su se razvili i razgranali u svijetu u kojem su DNA virusi inficirali RNA stanice (Forterre 2005., 2006.).

Forterre je razlučio RNA svijet u dva doba. Prvo doba obuhvaća period prije pojave ribosoma i predstavlja čisti RNA svijet dok drugo doba čini ribonukleoproteinski svijet.

Forterre definira RNA svijet kao biosferu RNA stanica (forterre, 2005.). Te stanice su imale različite mehanizme za preživljavanje i bile su u međusobnoj kompeticiji. U prvom dobu RNA svijeta stanice su razvile različite mehanizme za slaganje aminokiselina u peptide, razvile su se drukčije linije RNA stanica. sve te linije kasnije su nadvladane RNA stanicom koja je sadržavala preteču današnjih ribosoma, započelo je drugo doba RNA svijeta, ribonukleoproteinsko doba. Povijest se ponovila, razvile su se različite stanične linije sa modernim proteinima koje su se međusobno natjecale sve dok nisu nastale prve DNA stanice koje su označile kraj RNA svijeta (Slika 5.).



Slika 5. Dva doba RNA svijeta

Preuzeto iz Two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells, Patrick Forterre, 2005

Zbog žestoke kompeticije stanice koje nisu imale dobro razvijenu proteinsku mašineriju razvile su druge strategije. Da bi preživjele te stanice su postale unutarstanični paraziti više uspješnih staničnih linija. Parazitskom redukcijom od drevnih staničnih linija nastali su virusi. Prvo su nastali RNA virusi iz kojih su se razvili DNA virusi.

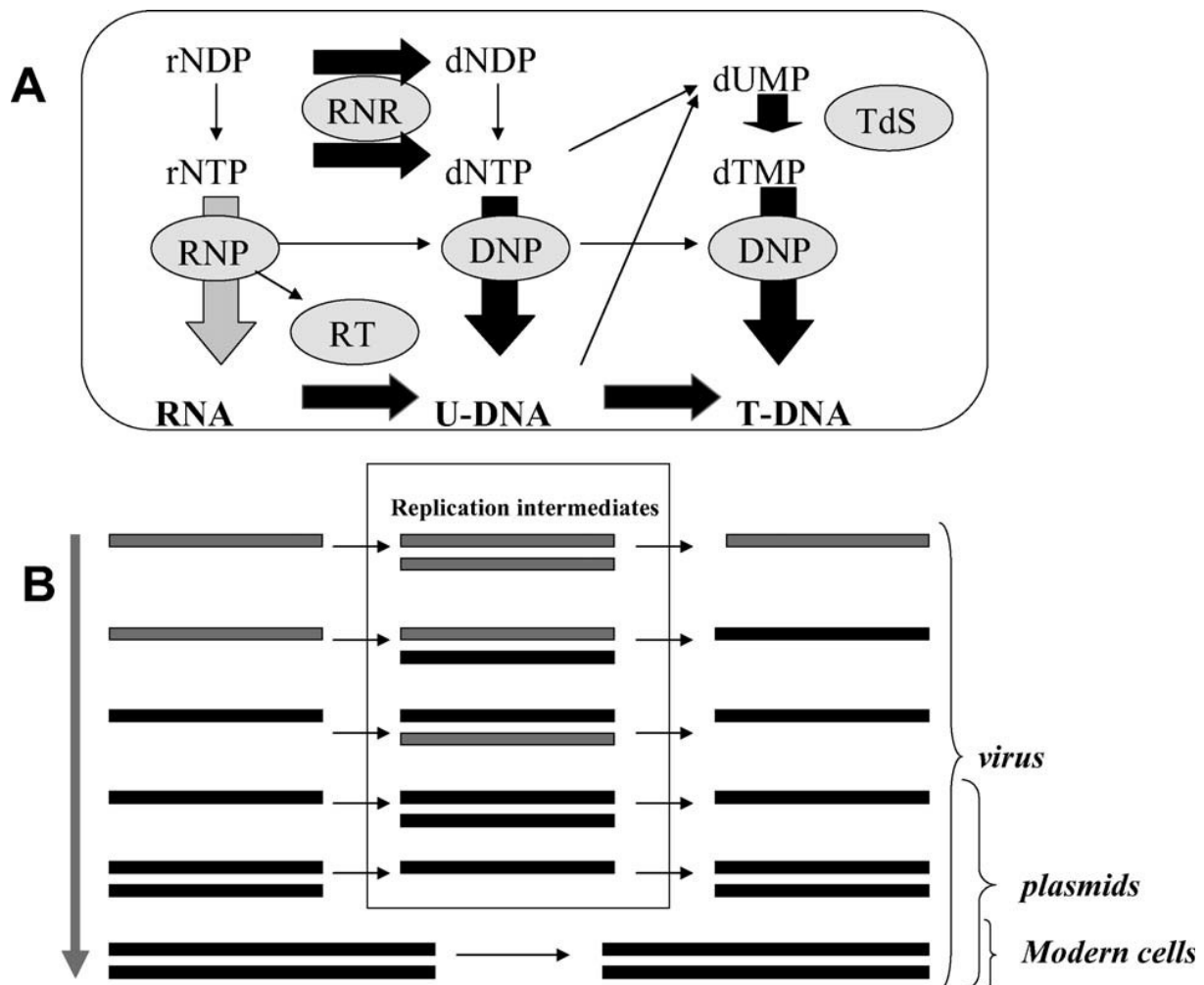
6.3. Nastanak DNA virusa

Ovakav razvoj događaja nudi potreban selektivni pritisak koji je potaknuo nastanak DNA. Virusi su morali modificirati svoj genom radi zaštite od RNaza domaćina. Neki moderni DNA virusi koriste slične tehnike, npr metilacija ili hidroksimetilacija vlastitog genoma. Iz toga je razumno pretpostaviti da su virusi bili promotori genomskih modifikacija iz RNA u U-DNA i iz U-DNA u T-DNA (U kao uracil i T kao timin). DNA virusi bi tako bili otporni na sve mehanizme zaštite izmišljene u RNA stanicama.

Virusi koji su sačuvali RNA genom imaju alternativne oblike zaštite, npr. RNA se čuva u kapsidi cijelo vrijeme infekcije, imaju enzime koji inhibiraju razgradnju RNA ili modificiraju stanične enzime (Forterre, 2005.).

Za nastanak DNA potrebni su kompleksni enzimi. Ideju da su se timidilat sintaza (sinteza timina, TdS) i ribonukleotid reduktaza (redukcija u deoksi šećere, RNR) prvo pojavile u virusnim genomima i da su prenesene u stanice podupiru filogenetske analize ovih enzima koji su gledajući sekvence miješani virusno-stanični. Mnogi virusi kodiraju TdS i RNR koje su samo malo slične onima njihovih domaćina.

DNA genom je nastao u više koraka prema sve kompliciranijim strukturama i replikacijskim mehanizmima. Najjednostavniji korak → RNA virus sa dvolančanim intermedijerom postaje jednolančani DNA virus sa DNA/RNA intermedijerom, u tom slučaju virus je mogao reverznom transkriptazom stvoriti RNA iz DNA i u drugoj turi transkribirati DNA u RNA. Od ove točke je nastala diverzifikacija; pojava virusa koji se repliciraju bez RNA (izum DNA ovisne DNA polimeraze), ujedno je nastala i mogućnost dvolančanosti. Prvi dvolančani genomi su se vjerojatno replicirali asimetričnim mehanizmom, prvo jedan pa drugi lanac, bila je potrebna samo DNA polimeraza sa mogućnosti napuštanja lanaca, a kasnije su se pojavile helikaze i faktori procesivnosti (forterre 2005., 2006.), (Slika 6.).



Slika 6. Prijelaz iz RNA u DNA

A: enzimski prijelazi potrebni za prijelaz iz RNA u U-DNA i T-DNA; RNR : ribonukleotid reduktaza, TdS: timidilat sintaza, RNP: RNA polimeraza, DNP: DNA polimeraza, RT: reverzna transkriptaza

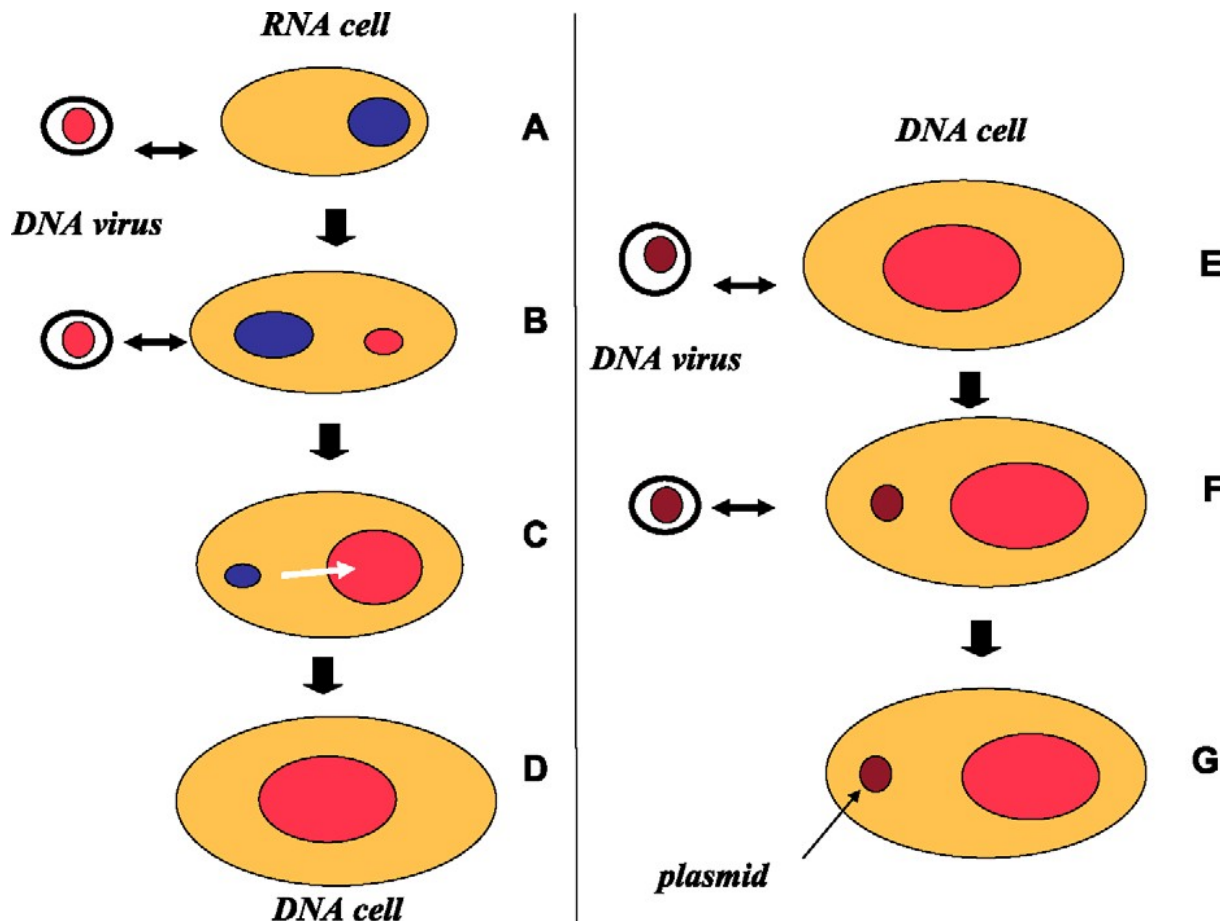
B: evolucija genomskih replikacijskih mehanizama. Sive ploče predstavljaju RNA, a crne DNA. Strelice upućuju na evolucijski put prijelaza od jednolančane RNA do dvolančane DNA.

Preuzeto iz Two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells, Patrick Forterre, 2005.

6.4. Prijenos DNA iz Virusa u stanice

Mogući model prijelaza DNA iz virusa u stanice dao je Forterre (Forterre 2005.), (Slika 7.). DNA virus je je inficirao RNA stanicu (Slika 7., A) i s njom koevoluirao (Sl. 7., B). Geni iz staničnog RNA genoma su progresivno preneseni u viralni DNA genom retrotranskripcijom i virusni genom je evoluirao u DNA plazmid RNA stanice (Sl. 7., C). DNA plazmid je nadvladao RNA genom i postao je DNA stanični kromosom (Sl. 7., D). Infekcija DNA stanice DNA virusom mogla je sličnim mehanizmom dovesti do nastanka

DNA stanice sa plazmidom i kromosomom (Sl. 7., E-G). Tako su nastale prokariotske stanice. Virusi su mogli formirati eukariotsku stanicu svojim genima koji su regrutirali unutarstanične membrane za oblikovanje jezgre .



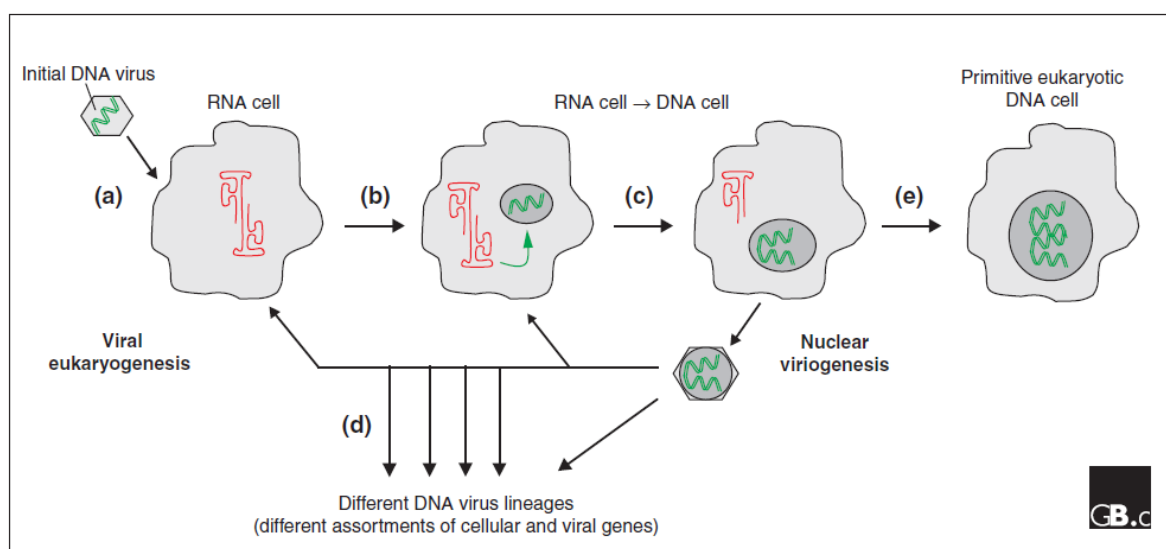
Slika 7. Model kojim se objašnjava prijenos DNA iz virusa u stanice za nastanak staničnih DNA kromosoma i plazmida. DNA genom je obojan crveno, a RNA genom plavo

Preuzeto iz Two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells, Patrick Forterre, 2005.

6.5. Virusna nukleogeneza

Virusi su prema gore predloženom modelu zaslužni i za eukariotsku jezgru. DNA virus je u DNA stanici preuzet i adaptiran u novi organel, teorija viralne nukleogeneze (Slika 8.). Jezgra se može promatrati kao sebični DNA virus. Ako takav virus ima sposobnost izlaženja iz stanica ne samo da od virusa može nastati jezgra, nego i od jezgre može nastati virus, nuklearna virogeneza. (Claverie, 2006)

Takva eukariogeneza-virogeneza objašnjava svu moguću raznolikost današnjih virusa jer su oni mogli nastajati u valovima ponavljajuće nuklearne virogeneze.



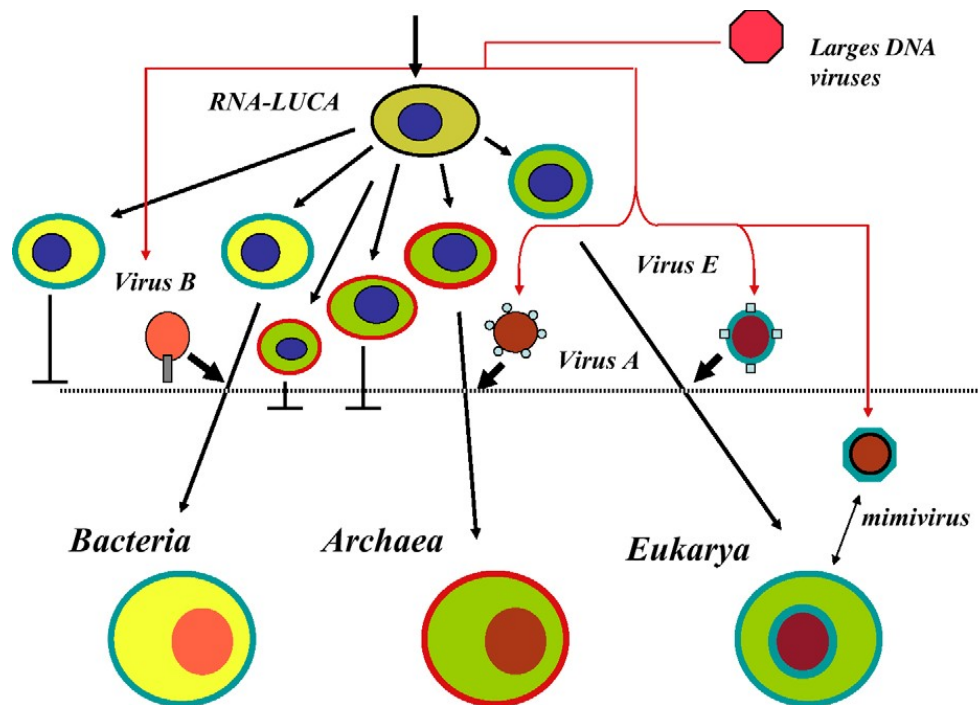
Slika 8. Moguć scenarij za viralnu eukariogenezu. (a) Primitivni DNA virus (predak bakteriofaga) nakon ulaska u RNA stanicu ostane u njoj i postane primitivna jezgra. (b) Stanični geni se postupno prenose u jezgru zbog toga što DNA omogućava selektivnu prednost. (c) Neko vrijeme ova situacija je nestabilna i reverzibilna, mogu nastati pre-eukariotski virusi. Ovi virusi tada mogu inficirati druge stanice u različitim stupnjevima ponavljajućeg procesa. (d) Ova hipotetska shema omogućuje pojavu virusa koji nisu monofiletski, ali zbog brze izmjene gena između različitih genskih bazena postoje preklapanja u linijama različitih virusa. (e) Evolucija stabilne eukariotske stanice sa potpuno razvijenim DNA jezgrenim genomom.

Preuzeto iz *Viruses take center stage in cellular evolution*, Jean-Michael Claverie, 2006

6.6. Virusi i tri moderne stanične domene

Hipoteza da je DNA prenesena, skupa sa proteinima za replikaciju, iz virusa u stanice je originalno bila predložena da bi objasnila postojanje 2 seta nehomolognih DNA replikacijskih proteina, jedan set kod bakterija i drugi kod arheja i eukariota. Za to su bila potrebna 2 neovisna transfera replikacijskih aparata. Već puno puta spomenuti Forterre je ponudio vlastitu teoriju. Ako su se mogla dogoditi 2 prijenosa replikacijskih proteina, onda su se mogla dogoditi i 3, a kao vektor su poslužila 3 različita DNA virusa. U tom slučaju LUCA je još uvijek imao RNA genom. Trima nezavisnim transferima nastale su današnje 3 domene (Slika 9.). Tri virusa tri domene hipoteza objašnjava zašto eukariotski i arhealni replikacijski proteini, iako slični, pokazuju kritične razlike. Tako glavne eukariotske topoizomerase filogenetski nisu povezane s arhealnim. Uz to arheje sadrže polimeraze obitelji D koje nemaju eukariotske homologe, također polimeraze koje homologne između njih nisu specifično srodstveno povezane. Tu su i brojni drugi proteini za DNA rekombinaciju koju ukazuju za dijelom odvojeno podrijetlo arheja i eukariota. Tradicionalno se smatra da su eukarioti nastali od arheja i bakterija endosimbiotskim događajima. Postojeće homologije između proteina prisutnih u sve tri domene (npr, rekombinaze slične recA rekombinazi iz bakterija ili faktori procesivnosti DNA polimeraza (PCNA) (Forterre, 2006.)), moguće je objasniti postojanjem tri virusa od kojih su te domene nastale. Treba samo pretpostaviti da su ti virusi imali male zajedničke setove homolognih kromosoma.

Razvoj života od zajedničkog pretka (LUCA sa DNA ili RNA genomom) nije kontinuiran, postojeće domene su međusobno odvojene svaka sa svojim karakteristikama, kao što bi bilo očekivano ako su nastale odvojeno → tri virusa tri domene.



Slika 9. Formiranje tri domene trima odvojenim DNA transferima iz virusa u RNA stanice.
 Preuzeto iz Two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells, Patrick Forterre, 2005.

7. LITERATURA

Banda, C. I. 2009. The Origin and Evolution of Viruses as Molecular Organisms

Carter, J. B. i Sanders V. A. 2007, Virology : principles and applications. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, str. 1

Claverie, J. M. 2006. Viruses take center stage in cellular evolution. *Genome Biology* 2006, 7:110

Eigen, M. i Winkler-Oswatitsch R. 1992. **Steps towards life: A perspective on evolution.** Oxford University Press, str. 30-37

File'e, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., Laurent, J. 2001. Evolution of DNA Polymerase Families: Evidences for Multiple Gene Exchange Between Cellular and Viral Proteins. *Journal of molecular biology*, *J Mol Evol* (2002) 54:763–773

Forterre, P. 2009.a Defining Life: The Virus Viewpoint. *Orig Life Evol Biosph* (2010) 40:151–160

Forterre, P. i Prangishvili, D. 2009.b The Great Billion-year War between Ribosome- and Capsid-encoding Organisms (Cells and Viruses) as the Major Source of Evolutionary Novelties

Forterre, P. 2006. Review: The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Research* 117 (2006) 5–16

Forterre, P. 2005. The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie* 87 (2005) 793–803

Hazen, R. M. 2009. Emergence and the experimental pursuit of the origin of life. Exploring the origin, extent and future of life, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York, str. 21-41

Kolb, V. M. i Liesch P. J. 2008 Abiotic, biotic and in-between. Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology XI, edited by Richard B. Hoover, Gilbert V. Levin, Alexei Yu. Rozanov, Paul C.W. Davies, Proc. of SPIE Vol. 7097, 70970A, (2008) · 0277-786X/08/\$18 · doi: 10.1117/12.792668

Koonin, E. V., Senkevich, T. G. i Dolja, V. V. 2006. The ancient virus world and the evolution of cells. *Biology direct* 2006., 1:29

Mahy, B. W. J. i van Regenmortel, M. H. V. Desk encyclopedia of general virology Linacre House, Jordan Hill, Oxford, OX2 8DP, UK525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, USA, Copyright 2010 Elsevier Ltd., str. 24-30

Morse, S. S. The evolutionary biology of viruses. Raven Press, Ltd, 1185 Avenue of the Americas , New York, New York 10036. Copyright 1994 by Raven Press, Ltd, str. 2-6

Moreira, D. i Lopez-Garcia, P. 2009. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nature Reviews Microbiology* vol 7, 306-311

Orgel, L. L. 2004. Prebiotic Chemistry and the Origin of the RNA World. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39:99–123, 2004

Villarreal, L. P. i Witzany, G. 2009. Viruses are essential agents within the roots and stem of the three of life. *Journal of theoretical biology*, 010 Feb 21;262(4):698-710

Villarreal, L. P. 2004. Can Viruses Make Us Human. p296-323v148n3, *Proceedings of the American Philosophical Society*, Sep 2004.

Villarreal, L. P. i DeFillips, V. R. 2000. A Hypothesis for DNA Viruses as the Origin of Eukaryotic Replication Proteins. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Aug. 2000., Vol 74, No.15, p. 7079–7084

Woese, C. R. 1998. The universal ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6854-6859.

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4576-4579.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews* **51** (2): 221–71

www.hudsonvalleyrnaclub.org/course/rna_lecture1_ferris012011.pdf

www.viralzone.expasy.org

8. SAŽETAK

Najstariji fosilni ostaci organizama stari su oko 3,8 milijuna godina. Prvi organizmi koji su obitavali na Zemlji nisu imali stanice. Bili su to makromolekulski sustavi od kojih su tokom kemijske evolucije nastale prve predstanične tvorbe, protobionti. Iz protobionata su vjerojatno nastale prve stanice, ali evolucijski put od nestaničnih do staničnih organizama nije poznat. Predloženo je da sva danas živa bića imaju jednog zajedničkog pretka. LUCA (Last universal common ancestor) se nalazi u korijenu Stabla života koje prikazuje filogenetske odnose između vrsta. Stablo ima tri grane koje predstavljaju prokariotsku, arhealnu i eukariotsku domenu života.

Virusi su organizmi koji mogu egzistirati jedino kao paraziti. Ne smatraju se živima i donedavno su smatrani pasivnim promatračima evolucije. Radikalne nove hipoteze o virusima su predložene. Metode molekularne biologije su pokazale da su virusi vrlo stari i da su virusi bili aktivni promotori evolucije ranih organizama. Nove teorije su virusima dale glavnu ulogu u svim važnim evolucijskim prijelazima.

9. SUMMARY

The oldest fossile records of organisms are about 3,8 million years old. First organisms that resided on Earth didn't have cells. They were macromolecular systems from which during the chemical evolution first precellular forms, protobionts, were formed. First cells probably originated from protobionts, but the evolutionary pathway from precellular to cellular organisms is not known. It has been suggested that all today living beings have one common ancestor). LUCA (Last universal common ancestor) is at root of the Tree of life, which presents phylogenetic relationships between the species. The Tree has three branches that represent prokaryotic, arheal and eukaryotic domain of life.

Viruses are organisms that can exist only as a parasites. They are not considered alive and until recently were viewed as the passive observers of evolution. Radical new hypotheses about viruses were suggested. Methods of molecular biology have shown that viruses are very old and that they were active promoters of evolution of the early organisms. New theories gave viruses leading role in all major evolutionary transitions.